

小型魚類用シャトル箱の開発

——ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) を用いて——

獅々見 照・獅々見元太郎

(受付 2008年10月31日)

近年、生物科学の領域では、遺伝子改変動物（ノックアウトマウスなどの）を用いて心理学のお家芸ともいえる学習・記憶研究が盛んに行われるようになってきている（詳しくは、山田（2003）を参照のこと）。この領域で、遺伝子と、その発現としての行動の関係が注目されるに至って、心理学者には学習、記憶、行動における標準化された実験手続きや過去の実験から得られたこれらの現象に関する知見を遺伝子研究の研究者に提供することが求められている。

このような趨勢にあって、小型脊椎魚類、なかでも体長3, 4 cm のゼブラフィッシュやメダカが生物科学の分野で一躍注目され始めてきた。2007年5月14日の朝日新聞には「バイオ研究の『顔役』への期待—注目されるニホンメダカ—」と題する特集記事も組まれた（添田, 2007）。これらの脊椎魚類はヒトと共通の遺伝子も多い（ゼブラフィッシュでヒト遺伝子との相同性は約70%である）ことから、ヒトの様々な疾患のモデル動物としても利用されることが大いに期待されている（なお、メダカではゲノム解析が終了している）。実験動物としてもこれらの動物は、非常に安価で、飼育が容易で、スペースもとらず、成長が早いいため、一度に大量の実験を行えるという利点を持っている。そのため、例えばゼブラフィッシュをモデル動物にした研究は、世界中で400以上の研究室でさかんに行われている（Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008）。

モデル動物を用いた行動研究において実験手続きの標準化と改良は必須条件である（Bilotta, Risner, Davis, & Haggbloom, 2005）。そこで、本実験では、ゼブラフィッシュを用いて、シャトル箱事態における行動実験手続きの標準化を試みた^{注1}。

* 本研究は、第1著者の広島修道大学からハワイ大学 Bekey Laboratory of Neurobiology への派遣研究（期間：2007年9月1日から2008年8月31日までの1年間、研究テーマ：学習の比較心理学的研究—無脊椎動物および下等脊椎動物の学習—）によるものである。

* 本研究の実施にあたりハワイ大学 Bekey Laboratory of Neurobiology の Dr. M. E. Bitterman と Dr. P. A. Couvillon の指導と助言を得たので、謝意を表します。また、本実験の装置は同研究所の Dr. Hinano Akaka と Mr. Ted Murphy によって作製されたので、両氏にも感謝いたします。

注1. 今回、被験体をゼブラフィッシュにした理由のひとつは、ハワイではゼブラフィッシュの入手が容易であるということである。いっぽう、野生のメダカは、過去に日本から輸入されてハワイ各

ゼブラフィッシュのような学習・記憶に関する情報の比較的少ない魚類を使った行動実験の標準化において生産的な方法は、すでに多くの研究が行われ、実験事態、実験手続きの確立されている同じ魚類であるキンギョの実験を応用することである (Bitterman, 2006)。これまで、キンギョのシャトル箱を用いた条件づけ実験は数多く行われており、その実験手続きも確立されている。古典的条件づけにおいては、単純な条件づけ実験 (Woodard, & Bitterman, 1973; Zerbolio, 1980)、潜在制止実験 (Shishimi, 1985)、信号付き電撃選好 (preference for signaled shock; PSS) 実験 (獅々見・佐野・福井, 1990) などが行われ、条件反応が確実に獲得されることが示されている。そして、この実験事態においては、条件づけの数理モデルが提案される (Zhuikov, Couvillon, & Bitterman, 1994) 段階にまで達している。

道具的条件づけにおいては、おもに回避条件づけが研究され、弁別回避条件づけ実験 (Woodard, & Bitterman, 1971; Woodard, & Bitterman, 1973) やシドマン型回避条件づけ実験 (Behrend, & Bitterman, 1963; 獅々見, 1990) が行われ、回避反応が容易に獲得されることが示されている。実験 1 では、キンギョの条件づけ実験で用いられてきたシャトル箱を用いてゼブラフィッシュの古典的分化条件づけを試みた。

実 験 1

本実験の目的は、ゼブラフィッシュを用いて分化条件づけを試み、キンギョ (獅々見・山本・坂田, 1994; Woodard, & Bitterman, 1971) 同様、ゼブラフィッシュが色光を弁別できるか否かを検討することである。

方 法

被験体 被験体は地元の業者から購入した12尾のゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) で、50cm 幅の大型水槽で集団飼育された後、実験室の 1-gal の個別水槽に移され飼育された。毎日、実験終了後に Tetramin のフレークを細かく砕いたものを少量与えた。

装 置 装置は Horner, *et al.* (1961) に記述されているのとほぼ同じデザインに基づく 4 台の魚用シャトル箱であった (Photo 1)。ただし、そのサイズは少し大きめであった。各シャ

地の田に放されたものの、現在では絶滅したと考えられている。地元のペットショップには、メダカ medaka という名前で流通している小型のサカナがいるが、著者らが実際に店に行って調べてみたところ、体の特徴からカダヤシであることがわかった。メダカをアメリカ本土や日本から空輸することも考えたが、移送にともなう酸欠などの問題があるため、今回の実験で使用することは断念した。ゼブラフィッシュ用のシャトル箱実験が標準化できれば、ゼブラフィッシュよりやや小さめのメダカでも同じ実験装置と手続きを適用できるであろうと考えている (ゼブラフィッシュ用のシャトル箱を用いたメダカの条件づけ実験は、現在日本において計画中である)。



Photo 1. Shuttleboxes for Experiment 1.

トル箱は黒の亚克力板で出来ており、水槽部分の内径は $11.4 \times 25.4 \times 11.4$ cm であった。水槽の中央には上底の長さ 6 cm、下底の長さ 14.5 cm の黒の亚克力板製のハードルがあり、水槽を 2 つの部屋に分けていた。水深はハードル上 12 mm とした。水槽の両側壁には US 用の細いステンレス線（直径約 0.5 mm）が取り付けられていた。US はこれらの電極から水中に流された。水槽の両端には内径 $11 \times 10 \times 11.2$ cm の CS 部屋が隣接しており、各部屋には赤色と緑色の LED 球（DC 12v 用に DC 9v を供給）が設置されていた。CS 部屋と水槽の間は透明の亚克力板（厚さ 5 mm）で隔てられていた。さらに CS 部屋の内部は半透明の薄いプラスチックで覆われていて、LED 球からの光を反射して水槽と CS 部屋の隔壁を一緒に照らした。今回の実験ではキンギョよりもさらに小さな動物を用いるため、ハードル上の 2 対のフォトビームの位置をハードル上 5 mm とし、さらに投光部と受光部の窓を 2 mm ネジ用のワッシャーで覆って小動物の通過の検出をより確実なものにした。シャトル反応は動物のいる側のビームを横切った後、反対側のビームを切って部屋の間を移動することと定義された。実験制御および実験データの収集はデスクトップコンピューターにより行った。なお、制御プログラムは Windows 98 上で走る Quick Basic ver. 4.5 であった。

手続き 被験体は条件づけ訓練に先立って、1日 40 min の馴致を 4 日間受けた。馴致期間中、被験体はシャトル箱内に放置され、いかなる刺激も提示されない 30 回のブランク試行が与えられた。各試行に先行して 5 sec の pre-trial 期間を設け、各試行は 5 sec の first-trial 期間と 5 sec の second-trial 期間に分けられていた。各試行後には 5 sec の post-trial 期間を設けた。実験では、これらの期間に生じたシャトル反応を記録した。試行間隔は 40 sec, 70 sec, 100 sec の 3 種類からランダムに選んで配置した。したがって、試行間隔の平均は 70 sec であった。馴致に続いて 1日 40 min の分化条件づけ訓練を 34 日間行った。分化条件づけ

の前半の20日間（ステージ1）では US 強度が 0.55 v/cm であった。しかし、ステージ1での全体の反応水準は期待したよりも低かった。この遂行水準の低さは US 強度不足とそれにともなう条件づけの漸近値水準の低さによる可能性があったため、その後の14日間（ステージ2）では US 強度が 0.8 v/cm に引き上げられた。分化条件づけにおいては30試行のうち10試行が S+ 試行、10試行が S- 試行、残りの10試行がブランク試行で、これら3種類の試行はランダムに配置された。S+, S- はそれぞれ両 CS 部屋の LED 球を同時に点灯することであった。被験体の半数は 10 sec 間の赤色 LED の点灯が S+, 10 sec 間の緑色 LED の点灯が S- であった。残りの半数はこの逆であった。S+ 試行では 10 sec 間の CS の終了と同時に 0.25 sec の US（シングルパルス）が与えられた。

結果と考察

Figure 1 は馴致、分化条件づけ訓練中の各セッションにおける S+, S-, ブランク試行中の1試行あたりの初発反応数（少なくとも1回以上の反応の生じた試行数）の変化を表したものである。なお、馴致期間中の S+ 試行, S- 試行, ブランク試行は、もし分化条件づけ訓練が行われたとすればという仮定に基づく試行の種類であって、実際には全てブランク試行からなっている。

装置への馴致にともなって初発反応数は2日目に急激に増加し、その後は横ばいになって0.4から0.5の値を示している。馴致期間中の初発反応数に関して、試行（S+ 試行, S- 試行,

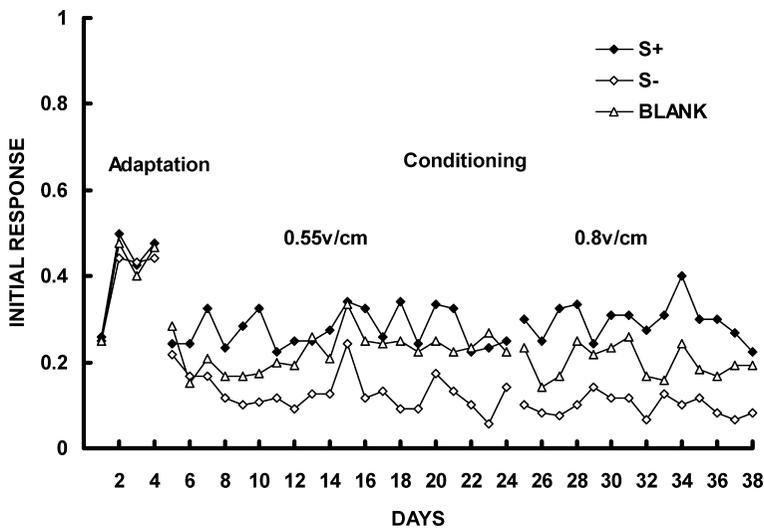


Figure 1. Mean initial responses per day. (S+ = CS paired with US; S- = CS unpaired with US; BLANK = no stimuli presented.)

ブランク試行)と日を被験体内の主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった($F_{(3, 33)}=6.854, p<.001$)。しかし、試行の効果は有意でなく($F<1$)、日と試行の相互作用効果も有意でなかった($F<1$)。

分化条件づけが始まると、全体に反応水準は低下し、その後S+およびブランク試行中の初発反応数は徐々に増加している。訓練の初期にはS+試行中の初発反応数の水準がブランク試行中のそれよりもやや高い傾向が見られるが、訓練の後半には両試行の初発反応数のレベルに大きな違いはない。分化条件づけ訓練に伴ってS-試行中の初発反応数の水準は低下し、S+, ブランク試行中の初発反応数の水準との間に顕著な差を生じている。

分化条件づけのステージ1の初発反応数に関して試行の種類と日を被験体内の主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意な傾向を示した($F_{(19, 209)}=1.503, p<.10$)。試行の効果は有意であったが($F_{(2, 22)}=3.758, p<.05$)、日と試行の相互作用効果は有意でなかった($F<1$)。試行の効果が有意であったのでRyan法による多重比較を行ったところ、S+試行とS-試行の間に有意差が認められたが($t_{(22)}=2.701, p<.05$)、S-試行とブランク試行の間の差は有意傾向にとどまった($t_{(22)}=1.757, p<.10$)。また、ブランク試行とS+試行の間には有意差は見られなかった($t_{(22)}=0.944, p>.10$)。

分化条件づけのステージ2の初発反応数に関して試行の種類と日を被験体内の主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意でなかったが($F_{(13, 143)}=1.486, p>.10$)、試行の効果は有意であった($F_{(2, 22)}=3.787, p<.05$)。また、日と試行の相互作用効果は有意でなかった($F<1$)。試行の効果が有意であったのでRyan法による多重比較を行ったところ、S+試行とS-試行の間に有意差が認められたが($t_{(22)}=2.752, p<.05$)、S+試行とブランク試行の間に有意差はなく($t_{(22)}=1.334, p>.10$)、ブランク試行とS+試行の間にも有意差はなかった($t_{(22)}=1.417, p>.10$)。

Figure 2は馴致、分化条件づけ訓練中の各セッションにおけるS+, S-, ブランク試行中の多重反応数(1試行あたりの総反応数)の変化を表したものである。なお、馴致期間中のS+試行、S-試行、ブランク試行は、もし分化条件づけ訓練が行われたとすればという仮定に基づく試行の種類であって、実際には同じブランク試行からなっている。

装置への馴致にともなって初発反応数は2日目に急激に増加し、その後は横ばいになって0.7前後の値を示している。馴致期間中の多重反応数に関して、試行(S+試行、S-試行、ブランク試行)と日を被験体内の主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった($F_{(3, 33)}=4.509, p<.01$)。試行の効果は有意でなく($F<1$)、日と試行の相互作用効果も有意でなかった($F<1$)。

分化条件づけが始まると、全体に反応水準は低下し、その後、訓練に伴ってS+およびブランク試行中の多重反応数はほとんど変化していない。いっぽう、S-試行中の多重反応数の

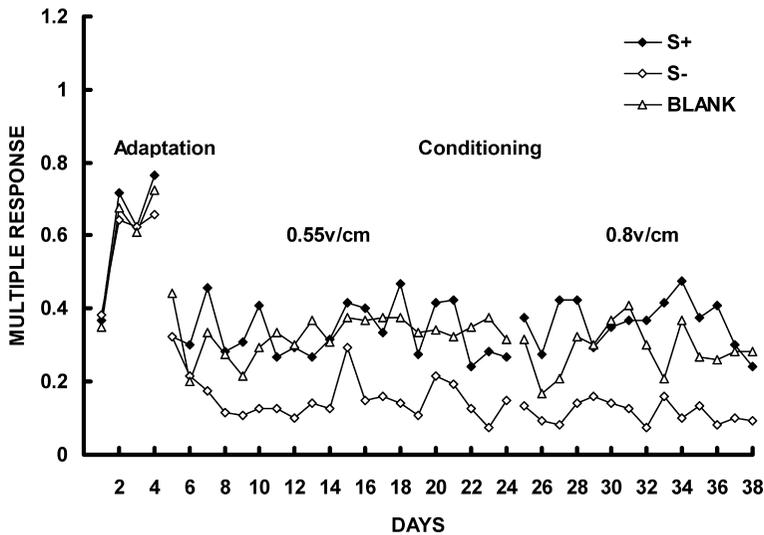


Figure 2. Mean multiple responses per day. (S+ = CS paired with US; S- = CS unpaired with US; BLANK = no stimuli presented.)

水準は訓練に伴って低下し、S+, ブランク試行中の多重反応数のそれらとの間に顕著な差を生じている。

分化条件づけのステージ1の多重反応数に関して試行の種類と日を被験体内の主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった ($F_{(19, 209)} = 1.664, p < .05$)。試行の効果は有意な傾向を示したが ($F_{(2, 22)} = 3.017, p < .10$)、日と試行の相互作用効果は有意でなかった ($F_{(38, 418)} = 1.011, p > .10$)。したがって、日の効果は主に S- 試行の多重反応数の低下を反映していると考えられる。

分化条件づけのステージ2の多重反応数に関して試行の種類と日を被験体内の主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意でなかった ($F_{(13, 143)} = 1.547, p > .10$)。試行の効果は有意な傾向を示したが ($F_{(2, 22)} = 3.153, p < .10$)、日と試行の相互作用効果は有意でなかった ($F_{(26, 286)} = 1.060, p > .10$)。

本実験の結果、特に S+ 試行と S- 試行の初発反応水準の違いから、ゼブラフィッシュの分化条件づけは成立したといえる。これは、ゼブラフィッシュが色光の弁別が可能である、ということの意味している。したがって、色光をゼブラフィッシュの学習、記憶実験において利用できるということが実証された。

しかし、本実験ではブランク試行中の初発反応水準が高く、S+ 試行のそれとの間に差を生じなかった。分化条件づけのステージ2で US 強度を上げることによってブランク試行中の反応が抑えられることが予想されたが、この手続きにもかかわらず S+ 試行とブランク試行の間の遂行差は生じなかった。この原因としては、US を与えられた文脈自体がかなりの恐

怖条件づけを獲得したため試行間に遂行差が生じなかったことが考えられる。

本実験における大きな問題は、分化条件づけ訓練における反応の水準が全般的に低かったことにある。本実験と同様のシャトル箱を用いたキンギョの古典的条件づけにおいては初発反応数の生起確率は80%を超えている (Woodard, & Bitterman, 1973; Zhuikov, *et al.*, 1994)。本実験の初発反応数で見ると、S+ 試行中の初発反応数の生起確率は試行の25%から30%の水準にしか達していない。この反応水準の低さが S+ 試行とブランク試行の差を検出できなかった原因になっている可能性もある。では、何故シャトル反応の水準が全体に低かったのだろうか。

そのひとつの原因として考えられるのが、ゼブラフィッシュのサイズに比してシャトル箱のそれが大きすぎたことである。古典的条件づけによって被験体の活動性が增大すると、シャトル反応が起きる確率も増大すると考えられる。したがって、シャトル箱のサイズが大きくなれば、それだけ往復に要する距離および時間も増大するため、結果として単位時間あたりのシャトル反応数が少なくなるはずである。

つぎに考えられる原因は、日常の観察から筆者らによって考えられたものである。飼育水槽内のゼブラフィッシュを捕捉しようとする時、彼らは底面を泳ぎ、小石の間に身を潜めようとする。ゼブラフィッシュのような小動物は大型魚類などの天敵の攻撃を受けやすいため、天敵の接近の予想される事態において水面近くに上昇することは敵の攻撃を容易にする。むしろ底面に留まるほうが安全なのである。それでも敵に発見された場合は、底面に沿って泳いで安全な窪みに逃げ込むことが有効であると考えられる。つまり、ゼブラフィッシュのような被食者の小動物は、危険の予想されるシャトル箱事態においては、水面近くまで上昇してバリアを越えて移動することが起きにくいと考えられる。この生得的反応傾向が本実験の反応水準の低さに反映したのではないだろうか。

もうひとつ考えられる原因は、逃避随伴性である。キンギョの実験 (Zhuikov, *et al.*, 1994) においてもシャトル反応の生起を促すために反応が生じるまでパルス電撃を間歇的に与えるという逃避随伴性が導入されている。本実験においてもこの逃避随伴性を導入していれば反応水準はもっと高くなっていた可能性はある。しかし、キンギョにおいては逃避随伴性がなくとも古典的条件づけによってシャトル反応が高水準にまで獲得されるという報告もあり (Woodard, & Bitterman, 1973), 逃避随伴性が両動物の間に大きな遂行差をもたらした主たる原因であるとは考えにくい。

そこで、実験 2a では、先述したゼブラフィッシュの行動特性に注目して、バリアの底をくぐって部屋の間を移動するというシャトル箱を考案して実験を行った。また、シャトル反応の出現頻度を高めるために、ゼブラフィッシュのサイズに合わせてシャトル箱のサイズを実験 1 よりも小さいものにした。さらに、Zhuikov ら (1994) の実験で用いられた逃避随伴

性と同様、間歇的に電撃を与えることによってシャトル反応の生起を促す手段としてシドマン型回避条件づけ手続きを採用した。

実 験 2a

本実験の目的は、ゼブラフィッシュのサイズに合わせた小型のシャトル箱を用い、バリアの底部をくぐるシャトル反応を基準反応とするシドマン型回避訓練を実施して、回避学習の成立の正否を確かめることである。

方 法

被験体 被験体は実験 1 同様、地元の業者から購入したゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 6 尾で、大型水槽内で飼育された後、実験室の個別水槽内で飼育された。毎日、実験終了後に Tetramin のフレークを細かく砕いたものを少量与えた。

装 置 装置は Horner, *et al.* (1961) に記述されているのとはほぼ同じデザインに基づく 1 台の魚用シャトル箱であった (Photo 2)。シャトル箱は黒の亚克力板で出来ており、水槽部分の内径は $7.1 \times 16.8 \times 6$ cm であった。水槽の中央には厚さ 6 mm の黒の亚克力板製のバリアがあり、水槽を 2 つの部屋に分けていた。バリアの底には 12×50 mm の開口部があった。水槽の両側壁には US 用のステンレス板が貼られていた。US はこれらの電極から水中に流された。水深は 3 cm であった。水槽の両端には内径 $7.1 \times 8 \times 6$ cm の CS 部屋が隣接しており、各部屋には赤色と緑色の LED 球 (DC 12v 用に DC 9v を供給) が設置されていた。



Photo 2. A shuttlebox for Experiment 2a and 2b.

CS 部屋と水槽の間は透明のアクリル板（厚さ 3 mm）で隔てられていた。さらに CS 部屋の内部は半透明の薄いプラスチックで覆われていて、LED 球からの光を反射して水槽と CS 部屋の隔壁を一様に照らした。今回の実験ではバリアの開口部を通過する反応を検出するためバリアの両側の底面から 6 mm 上のところに 2 対のフォトセンサーを設置した（センサーの中心—中心間隔は 12 mm）。シャトル反応は動物のいる側のビームを横切った後、反対側のビームを切って部屋の間を移動することと定義された。実験制御および実験データの収集は SYSMAC mini SP20 により行った。（なお、参考までに 4 台のシャトル箱のシャトル反応を検出する SYSMAC mini SP20 のプログラムを Appendix に示した。）

手続き シドマン型回避訓練に先立って、6 尾の被験体は 1 日 920 sec の装置への馴致を 4 日間与えられた。馴致期間中、各被験体は装置内に放置され、シャトル反応数と、もし US が与えられたと仮定した場合に受けたであろう US 回数（以下、仮定的 US 回数と呼ぶ）が記録された。その後、全被験体は 1 日 920 sec のシドマン型回避訓練を 12 日間受けた。シドマン型回避訓練は、S-S 間隔、R-S 間隔とも 30 sec で、それぞれの間隔後に与えられる逃避不可能な US の長さは 0.4 sec であった。なお US の長さに関して、#00 は訓練期間中に変更されなかったが、#01、#02、#03、#04 は回避訓練の 10 日目から、#11 は回避訓練の 5 日目から 0.2 sec に短縮された。（これは、US に対する反応がすばやい場合には反応後に残りの時間 US を受けるということが生じたからである。）シャトル反応にともなって 4 尾の被験体には 5 sec の FS（両端の CS 部屋の LED 球の点灯）が与えられたが、その半数は赤色の FS、残りの半数は緑色の FS であった。これらの被験体では、FS 提示中の反応は R-S クロックをリセットしたが、FS の提示には影響しなかった。2 尾の被験体はシャトル反応にともなって FS が与えられなかった。回避訓練中はシャトル反応数、FS 提示回数（FS の与えられなかった 2 尾の被験体では、もし FS が与えられたと仮定した場合に与えられたであろう FS 回数（以下、仮定的 FS 回数と呼ぶ））、US 回数が記録された。シドマン型回避訓練に続いて消去訓練が 16 日間実施された。消去訓練中は、全被験体とも US が与えられないことを除いては、シドマン型回避訓練と同じ手続きが与えられた。装置への馴致を受けなかった 2 尾のうちの 1 尾 #00（赤色 FS を与えられた）は 36 日間の消去訓練の後 80 日間の保持間隔後に再び消去訓練を 1 日与えられた。消去訓練中は、全被験体とも反応数、FS 提示回数（FS の与えられなかった 2 尾の被験体では、仮定的 FS 回数）、仮定的 US 回数が記録された。

結果と考察

Figure 3 は、馴致、シドマン型回避訓練、消去訓練中の全被験体のシャトル反応数と US 回数（または仮定的 US 回数）の変化を表したものである。なお、馴致期間中のデータは馴

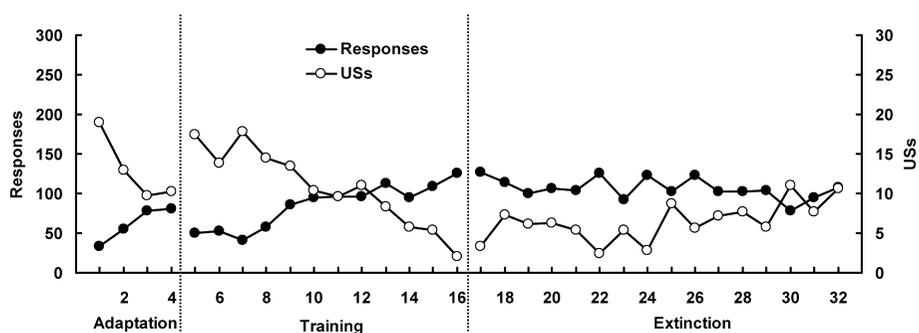


Figure 3. Mean number of responses and presented (or hypothetical) USs during adaptation, training, and extinction.

致を行った4尾の結果である。馴致にともなってセッション中の反応数は増加し、3日目にほぼ漸近値に達した後、約80のレベルを維持している。反応の増加にともない仮定的US回数も減少しているが、その最終的なレベルは約10である。シドマン型回避訓練が始まると、反応の水準は一度40前後に減少し、そこから徐々に増加して、馴致期間中の最終レベルを超えて約125のレベルにまで達している。US回数も馴致期間中の最終レベルより高いレベルから始まって、訓練にしたがってほぼ一貫して減少し、馴致期間の最終レベルを超えて約2の値にまで達している。消去訓練期間中は徐々に仮定的US回数は増加しているが、反応回数の減少はUS回数の変化よりもさらに緩やかである。

馴化期間中の反応数に関して1要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった ($F_{(3,9)} = 10.928, p < .01$)。同期間中の仮定的US回数に関して1要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった ($F_{(3,9)} = 8.222, p < .01$)。シドマン型回避訓練期間中の反応数に関して1要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった ($F_{(11,55)} = 3.308, p < .01$)。回避訓練期間中のUS回数に関して1要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であった ($F_{(11,55)} = 3.169, p < .01$)。消去期間中の反応数に関して1要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意でなかった ($F < 1$)。同期間中の仮定的US回数に関して1要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意でなかった ($F < 1$)。

Figure 4は個別別の結果を示したものである。#00の結果を見ると、一度獲得された反応は長期(60日間)の消去およびその後80日間の保持間隔にもかかわらず、維持されているのがわかる。#01, #02, #11も同様に、いったん獲得された反応は消去訓練に入っても維持された。シドマン型回避訓練、消去訓練を通じてFSの与えられなかった#03, #04では、消去に入ると反応は減少し、仮定的US回数も最大値の30に近い値にまで増加している。したがって、Figure 3の消去期間中の反応数およびUS回数の変化は、これら2尾の結果を反映していると考えられる。

獅々見・獅々見：小型魚類用シャトル箱の開発

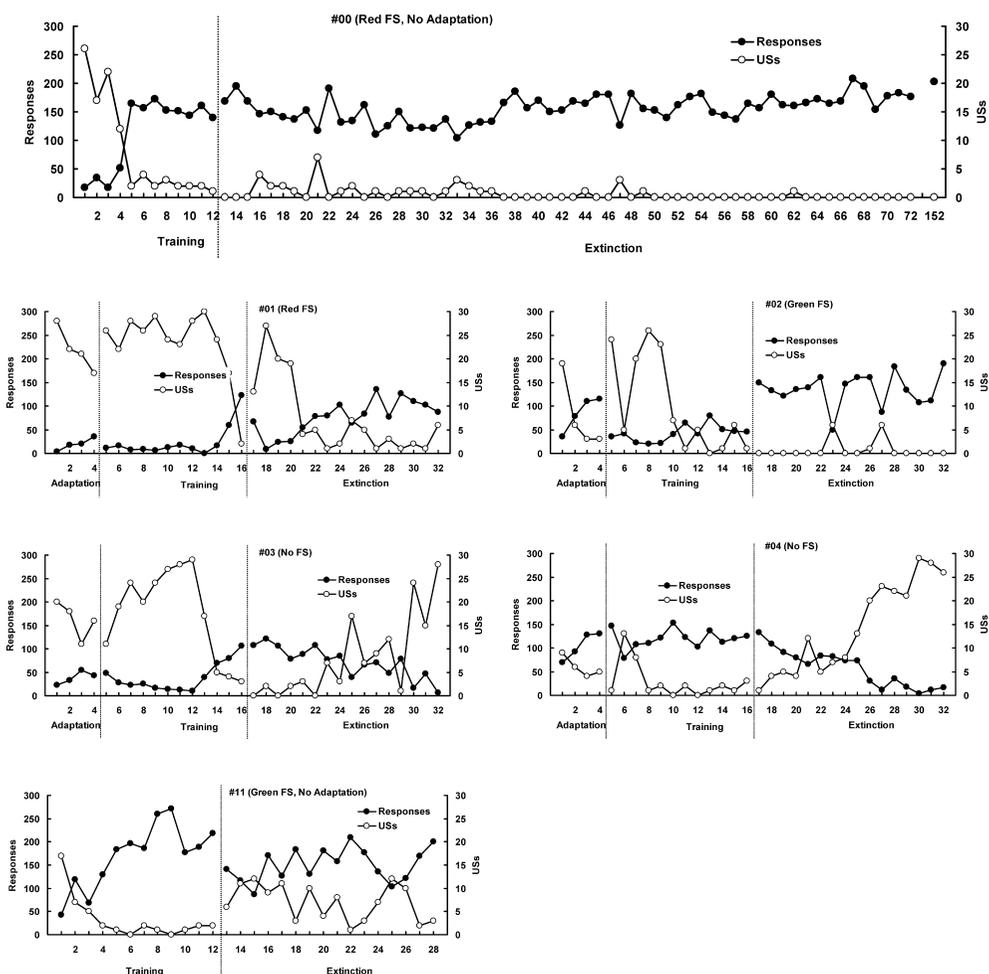


Figure 4. Mean number of responses and presented (or hypothetical) USs during adaptation, training, and extinction for each subject.

新しい装置と新しい回避反応基準の採用によってゼブラフィッシュのシャトル反応は FS 提示の有無にかかわらず獲得された。回避訓練の最終段階における反応水準（約125）はキンギョのシドマン型回避訓練（獅々見・山本, 1994）における反応水準（約65）よりも高かった。また、一度獲得された反応は消去され難いといえる。ただし、獲得、消去段階で FS を与えられなかった 2 尾の被験体では反応の消去が見られた。また、回避訓練段階では FS による回避反応の獲得を促進する効果（FS 効果）は見られなかった。また、消去訓練段階では個別に見ると、FS による回避反応維持効果のあることが示唆される。消去訓練段階における FS 効果は、外的 FS が回避訓練中に 2 次強化子としての特性を獲得し、これが消去訓練段階において反応を維持するのに貢献した、と考えられる（獅々見, 1987）。

実 験 2b

実験 2a では、回避訓練段階で FS 効果が見られなかったが、消去訓練段階では FS 効果を示唆する結果が得られた。しかし、実験 2a の被験体数は 6 尾と少なかったため、これらの結果を統計的に裏付けられたものとは言いがたい。そこで、実験 2b では、被験体数を増やして、回避訓練段階と消去訓練段階のそれぞれにおいて FS 提示条件を変化させる実験を試みて、FS 効果を検討した。

また、実験 2a では、回避訓練中に一部の被験体で、逃避不可能な US 提示中にすばやい反応が起きて、反応後も残りの時間 US を受けるという事態が生じた。反応後の US は罰効果をもつため、これが回避遂行を低下する要因として働くことも考えられた。そこで、5 尾の被験体では、回避訓練の後半に US の長さが 0.4 sec から 0.2 sec に短縮された。したがって、実験の標準化という目的を達するためには、US の長さを訓練の最初から 0.2 sec に設定した実験をあらためて行う必要があった。実験 2b では、この点を踏まえた手続きを採用した。

方 法

被験体 被験体は実験 1, 2a と同様、地元の業者から購入したゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 12尾で、飼育条件も同様であった。

装 置 実験 2a と同じ。

手続き シドマン型回避訓練に先立って、12尾の被験体は 1日 920 sec の装置への馴致を 4 日間与えられた。馴致期間中、各被験体は装置内に放置され、シャトル反応数と、もし US が与えられたと仮定した場合に受けたであろう US 回数 (仮定的 US 回数) が記録された。その後、全被験体は 1日 920 sec のシドマン型回避訓練を 12日間受けた。シドマン型回避訓練は、S-S 間隔、R-S 間隔とも 30 sec で、それぞれの間隔後に与えられる逃避不可能な US の長さは 0.2 sec であった。シャトル反応にともなって 8 尾の被験体には 5 sec の FS (両端の CS 部屋の LED 球の点灯) が与えられたが、その半数は赤色の FS、残りの半数は緑色の FS であった。これらの被験体では、FS 提示中の反応は R-S クロックをリセットしたが、FS の提示には影響しなかった。4 尾の被験体はシャトル反応にともなって FS が与えられなかった。回避訓練中はシャトル反応数、FS 提示回数 (FS の与えられなかった 4 尾の被験体では、仮定的 FS 回数)、US 回数が記録された。シドマン型回避訓練に続いて消去訓練が 16日間実施された。消去訓練中、全被験体とも US が与えられなかったが、回避訓練中に FS の与え

られた被験体の半数（4尾）は反応にともなって回避訓練と同じ FS が与えられ（以下、FS-FS 群と呼ぶ）、残りの半数（4尾）は FS が与えられなかった（以下 FS-NFS 群と呼ぶ）。回避訓練中に FS の与えられなかった4尾（以下、NFS-NFS 群と呼ぶ）は消去訓練中も FS が与えられなかった。消去訓練後、全被験体は80日間の保持間隔後に再び同じ消去訓練を1日与えられた。消去訓練中は、全被験体とも反応数、FS 提示回数（FS の与えられなかった4尾の被験体では、仮定的 FS 回数）、仮定的 US 回数が記録された。

結果と考察

Figure 5 は FS-FS 群、FS-NFS 群、NFS-NFS 群の馴致、回避訓練、消去訓練、再消去訓練中のシャトル反応数の変化を表したものである。馴致期間中の反応数は日を追って増加しているが、3群間に大きな差はみられない。馴致期間中の反応数に関して、群と日を主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であったが ($F_{(3, 27)} = 4.439, p < .05$)、群の効果は有意でなく ($F < 1$)、群と日の相互作用効果も有意でなかった ($F < 1$)。

回避訓練が始まると各群の反応数は馴致期間中の反応数よりも増加した。NFS-NFS 群に比べて2つの FS 群では反応数は大きな増加を示しており、最終的にはほぼ140から180の値となった。回避訓練中の反応数に関して、群と日を主効果とする2要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であったが ($F_{(11, 99)} = 3.111, p < .01$)、群の効果は有意でなく ($F < 1$)、群と日の相互作用効果も有意でなかった ($F < 1$)。

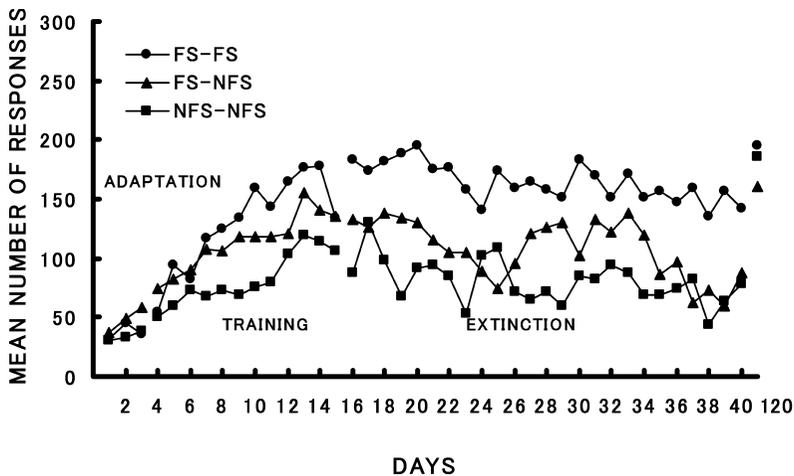


Figure 5. Mean number of responses during adaptation, training and extinction. (FS-FS = FS presented during both training and extinction; FS-NFS = FS presented during training and no FS presented during extinction; NFS-NFS = no FS presented during training and extinction.)

消去訓練段階では 3 群とも緩やかな反応数の減少を示している。回避訓練, 消去訓練を通して FS を提示された FS-FS 群の反応数の減少が他の 2 群に較べて少ない傾向にある。消去訓練の反応数に関して, 群と日を主効果とする 2 要因の分散分析を行ったところ, 日の効果は有意であったが ($F_{(23, 207)} = 2.809, p < .001$), 群の効果は有意でなく ($F_{(2, 9)} = 1.248, p > .10$), 群と日の相互作用効果も有意でなかった ($F_{(46, 207)} = 1.123, p > .10$)。

80日間の保持間隔後に行われた再消去訓練において FS-FS 群と FS-NFS 群の反応数は, 回避訓練の最終段階のレベルに復帰している。いっぽう, NFS-NFS 群の反応数は回避訓練の最終段階のそれよりも多くなっている。この反応数に関して 1 要因の分散分析を行ったところ, 群の効果は有意でなかった ($F < 1$)。

Figure 6 は FS-FS 群, FS-NFS 群, NFS-NFS 群の馴致, 回避訓練, 消去訓練, 再消去訓練中の US 回数 (あるいは仮定的 US 回数) の変化を表したものである。馴致期間中の 3 群の仮定的 US 回数は減少しているが, 3 群間に大きな差は見られない。馴致期間中の US 回数に関して, 群と日を主効果とする 2 要因の分散分析を行ったところ, 日の効果は有意であったが ($F_{(3, 27)} = 3.879, p < .05$), 群の効果は有意でなく ($F < 1$), 群と日の相互作用効果も有意でなかった ($F < 1$)。

回避訓練が始まると, 両 FS 群では US 回数が馴致期間中のレベルからさらに減少するが, NFS-NFS 群では, 馴致と訓練の両事態の弁別に時間がかかったためか, 第 1 日に馴致の最終日よりも少ないレベルから始まって, 第 2 日に馴致のレベルよりも多くなり, その後は減少している。回避訓練中の US 回数 (仮定的 US 回数) に関して, 群と日を主効果とする 2 要

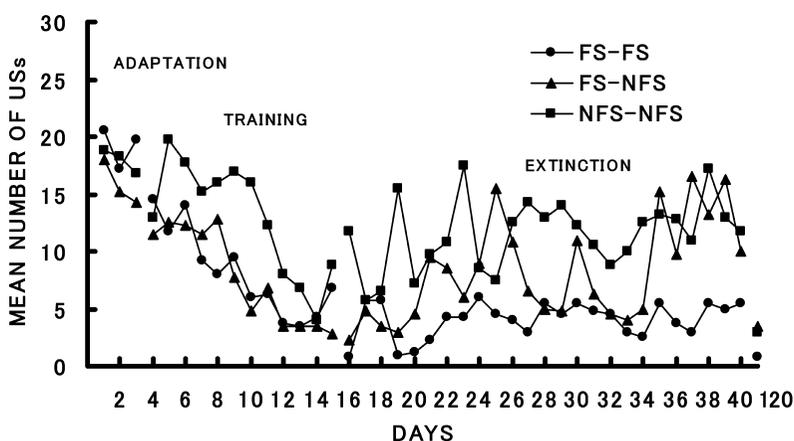


Figure 6. Mean number of presented (or hypothetical) USs during adaptation, training and extinction. (FS-FS = FS presented during both training and extinction; FS-NFS = FS presented during training and no FS presented during extinction; NFS-NFS = no FS presented during training and extinction.)

因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であったが ($F_{(11, 99)} = 5.120, p < .001$)、群の効果は有意でなく ($F_{(2, 9)} = 1.413, p > .10$)、群と日の相互作用効果も有意でなかった ($F < 1$)。

消去訓練段階では FS-FS 群と FS-NFS 群の変動が大きいものの、全般的には 3 群とも緩やかな仮定的 US 回数の増加を示している。最終的には回避訓練、消去訓練を通して FS を提示されなかった NFS-NFS 群の仮定的 US 回数の増加が他の 2 群に較べて少ない傾向にある。消去訓練の反応数に関して、群と日を主効果とする 2 要因の分散分析を行ったところ、日の効果は有意であったが ($F_{(23, 207)} = 1.679, p < .05$)、群の効果は有意でなく ($F < 1$)、群と日の相互作用効果も有意でなかった ($F_{(46, 207)} = 1.248, p > .10$)。

80日間の保持間隔後に行われた再消去訓練において FS-FS 群と NFS-NFS 群の仮定的 US 回数は、回避訓練の最終段階の US 回数のレベルよりもさらに低下している。いっぽう、FS-NFS 群の仮定的 US 回数は回避訓練の最終段階のそれとほぼ同じ水準に戻っている。この仮定的 US 回数について 1 要因の分散分析を行ったところ、群の効果は有意でなかった ($F < 1$)。

Figure 7 は馴致、回避訓練、消去訓練期間中の反応数と US 回数 (あるいは仮定的 US 回数) のグラフを個別に示したものである。FS-FS 群の回避訓練および消去訓練期間中の遂行を個別にみると、#01、#02、#04 がスムーズな回避反応の獲得と消去期間中の反応の維持および 80日間の間隔においても回避反応の保持を示したのに対して、#05 は獲得が遅れ、回避反応の消去も起きている。しかし、80日間の保持間隔後には回避反応の自発的回復を示している。

FS-NFS 群の回避訓練および消去訓練期間中の遂行を個別にみると、4 尾とも順調な回避反応の獲得を示しているが、消去訓練に入ると #03、#12 は不安定ながらも消去を示している。そして、80日間の保持間隔後には回避反応の自発的回復を示している。#06 は消去訓練期間中に緩やかな反応の減少を示したが、80日間の保持間隔後には回避反応は消去訓練の終わりの水準を維持していた。#11 では、消去訓練期間中は不安定ながらも回避反応が維持され、80日間の保持間隔の後では回避訓練時よりも顕著な回避反応傾向を示した。

NFS-NFS 群の回避訓練および消去訓練期間中の遂行を個別にみると、#07 は順調な回避反応の獲得を示したが、#08、#09 は回避訓練の終わりに回避反応の減少が見られて、反応の獲得が不安定であった。また、#10 の回避反応の獲得は緩やかで、訓練の終わりになっても漸近値水準に達していない。消去訓練に入ると、#07 は回避反応の消去を示したが、80日間の保持間隔後には反応の完全な自発的回復を示した。#08 では、不安定ながらも緩やかな回避反応の消去を示したが、80日間の保持間隔後には回避訓練時よりもいっそう顕著な回避反応傾向を示した。#09 は消去訓練中に不安定ながらも回避反応が維持され、80日間の保持間隔後には回避訓練の終わりの水準と変わらなかった。#10 は消去期間に入ると回避傾向が強められ、訓練の後半に消去が始まったが、80日間の保持間隔後には回避反応傾向は消去の初日の水準に戻った。個別データの分析から、実験全般を通して個体差の大きいことが示され

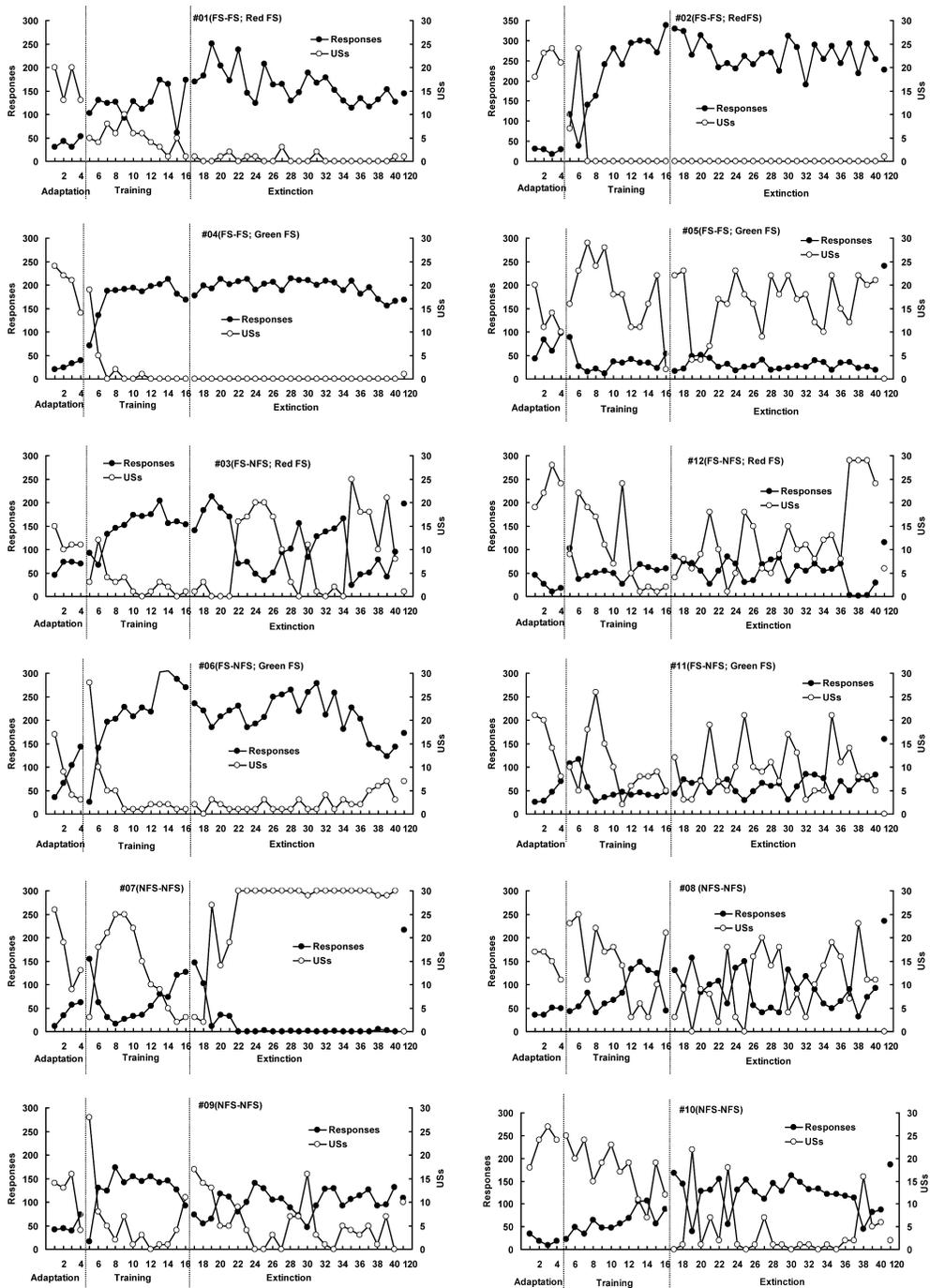


Figure 7. Mean number of responses and presented (or hypothetical) USs during adaptation, training and extinction for each subject.

た。これが、キンギョにおいて得られている FS 効果（獅々見, 1990; 獅々見・山本, 1994）が本実験の獲得および消去訓練において得られなかった理由のひとつとして考えられる。

総 合 論 議

本実験の目的は、ゼブラフィッシュのシャトル箱における条件づけ実験の標準化であった。実験 1 の古典的分化条件づけ実験の結果、ゼブラフィッシュがキンギョと同様に緑色と赤色の 2 色光を弁別できることを示した（獅々見・山本・坂田, 1994; Woodard, & Bitterman, 1971）。同様の結果は、ゼブラフィッシュの T 迷路課題においても得られている（Colwill, Raymond, Ferreira, & Escudero, 2005）。緑色と紫色（または、赤色と青色）のアームで区別した T 迷路において、一方のアームを選択した場合には餌が与えられ、他方のアームを選択すると餌は与えられない場合には、ゼブラフィッシュは正しい方のアームを選択した。したがって、ゼブラフィッシュの色光を用いた分化条件づけは、視覚系の発達研究に有用な実験手続きであると考えられる（Easter, & Nicola, 1996）。

しかしながら、実験 1 では条件づけ段階における反応水準は低く、初発反応測度において S+ 試行では約 0.3 (= 30%) にしか達しなかった。そして US 強度を 0.55 v/cm から 0.8 v/cm に上げて反応水準には影響しなかった。いっぽう、キンギョのシャトル箱事態における古典的条件づけでは、US 強度を上げると条件づけの漸近値水準も高くなるという結果が得られている（福井・獅々見, 1984）。このことから、実験 1 で使用された US 強度は十分に高い強度であったので、それ以上の強度に US を上げて遂行水準に反映されなかったと考えられる。むしろ、ゼブラフィッシュの行動の日常観察から、ゼブラフィッシュはストレス事態では水底に留まるか、水底を這うように泳ぐ傾向があり、このため、実験 1 で、水面近くまで上がって来て、ハードルを越えることが出来なかったのではないかと考えられた。この他、装置のサイズの大きすぎる問題、逃避随伴性の必要性の問題が指摘された。実験 2a, 2b では、これらの問題を解決するために、よりサイズの小さなシャトル箱を用い、ハードルを越える反応に変えてバリアの下を潜る反応を基準反応として採用した。また、獲得の初期においては、逃避随伴性と同様に間歇的に US の与えられるシドマン型回避訓練手続きを採用した。その結果、ほとんどの被験体が回避反応を獲得した。実際、本実験と同様にバリアの下を潜ることを基準反応としたゼブラフィッシュの弁別回避条件づけにおいて、回避反応の獲得が 3 セッション後には約 60% の水準にまで達したという報告がされている（Xu, Scott-Scheiern, Kempker, & Simons, 2007）。また、回避反応は、一度獲得されると US が与えられなくとも、長期間維持されることもわかった。しかしながら、キンギョで確認されている FS の回避反応促進効果（獅々見, 1990; 獅々見・山本, 1994）は、統計的には

確認されなかった。本実験において被験体数が少なかったことがこの結果に影響している可能性もある。今後の実験においては被験体数を増やして FS 効果を検討する必要があるだろう。

また、実験 1 で試みられた古典的分化条件づけを改良型のシャトル箱 (実験 2a, 2b) を用いて実施する必要がある。これによりキンギョのシャトル箱の古典的条件づけ、回避条件づけに基づいて提案された数理モデル (Zhuikov, *et al.*, 1994) をゼブラフィッシュの条件づけへの適用の可能性が検討できるからである。この検討を通じて、2つの種の条件づけが単に条件づけのパラメーターの違いによるものか、それとも条件づけのタイプの違いによるものかが明らかになるであろう。この問題は知性の進化を考える上で重要な研究テーマのひとつである (Bitterman, 1975)。

References

- Behrend, E. R., & Bitterman, M. E. (1963). Sidman avoidance in the fish. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, **6**, 47-52.
- Bitterman, M. E. (1975). The comparative analysis of learning. *Science*, **188**, 699-709.
- Bitterman, M. E. (2006). Classical conditioning since Pavlov. *Review of General Psychology*, **10**, 365-376.
- Bilotta, J., Risner, M. L., Davis, E. C., & Haggblom, S. J. (2005). Assessing appetitive choice discrimination learning in zebrafish. *Zebrafish*, **2**, 259-268.
- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., & Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, **70**, 19-31.
- Easter, S. S., Jr., & Nicola, G. N. (1996). The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology*, **180**, 646-663.
- 福井 宏・獅々見 照 (1984). キンギョの古典的条件づけに及ぼす US, CS 強度効果の検討 動物心理学年報, **34**, 75-85.
- Horner, J. L., Longo, N., & Bitterman, M. E. (1961). A shuttlebox for the fish and a control circuit of general applicability. *American Journal of Psychology*, **74**, 114-120.
- Shishimi, A. (1985). Latent inhibition experiments with goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative Psychology*, **99**, 316-327.
- 獅々見 照 (1990). キンギョのシドマン型回避におけるフィードバック刺激の機能—フィードバック (情報) 仮説対安全信号 (恐怖制止) 仮説— 心理学研究, **61**, 1-7.
- 獅々見 照・佐野 敏宣・福井 宏 (1990). CS-US 間隔がキンギョの信号付き電撃選択の漸進的水準に及ぼす効果 心理学研究, **60**, 370-377.
- 獅々見 照・山本 和紀 (1994). 動物学習の基礎実験 I—フィードバック刺激がキンギョのシドマン型回避条件づけに及ぼす効果の検討— 広島修大論集, **34**, 293-309.
- 獅々見 照・山本 和紀・坂田 省吾 (1994). 動物学習の基礎実験 II—色光を用いたキンギョの分化活動条件づけ— 広島修大論集, **35**, 161-181.
- 添田 孝史 (2007). バイオ研究の「顔役」へ期待—注目集めるニホンメダカ— 朝日新聞 5月14日朝刊
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, **83**, 13-34.
- Woodard, W. T., & Bitterman, M. E. (1971). Classical conditioning of goldfish in the shuttlebox. *Behavior Research Methods & Instrumentation*, **3**, 193-194.
- Woodard, W. T., & Bitterman, M. E. (1973). Pavlovian analysis of avoidance conditioning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **82**, 123-129.
- Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L., & Simons, K. (2007). Active avoidance conditioning in zebrafish

(*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, **87**, 72-77.

山田 一之 (編) (2003). 遺伝子と行動—ミュータントマウスの作製と行動変異の探求— ナカニシヤ出版

Zerbolio, D. J., Jr. (1972). An application of the comparative method: Is conditioned avoidance a classical or instrumental process in goldfish? In M. R. Denny (Ed.), *Comparative Psychology* (pp. 168-190). New York: John Wiley & Sons.

Zhuikov, A. Y., Couvillon, P. A., & Bitterman, M. E. (1994). Quantitative two-process analysis of avoidance conditioning in goldfish. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, **20**, 32-43.

Summary

Shuttlebox Experiments in Zebrafish (*Danio Rerio*)

Akira SHISHIMI and Gentaro SHISHIMI

The present shuttlebox experiments were attempted to standardize the procedure of zebrafish's aversive conditioning which could be used by biologists interested in learning and memory. In differential conditioning of Experiment 1, zebrafish developed color discrimination (between red and green CSs). However, low level of shuttling over the hurdle was observed in acquisition. A small shuttlebox with a barrier under which zebrafish could swim was devised for Experiments 2a and 2b. Most of the subjects acquired shuttling response with Sidman avoidance schedule (S-S = R-S = 30sec). Shuttling response was retained throughout extinction. The new shuttlebox for small fish turned out to be a promising apparatus in future biological research.

APPENDIX

SYSMAC mini SP20 program of detecting fish's shuttling responses and positions for four shuttleboxes.

ADDRESS	COMMANDS	FUN No.	DATA	COMMENT	ADDRESS	COMMANDS	FUN No.	DATA	COMMENT
0	NOP	00			59	LD		0006	BOX #03 PROGRAM
1	LD		0002	BOX#01 PROGRAM	60	DIFD	11	0202	
2	DIFD	11	0012		61	LD		0202	
3	LD		0012		62	DIFD	11	0203	
4	DIFD	11	0013		63	LD		0007	
5	LD		0003		64	DIFD	11	0204	
6	DIFD	11	0014		65	LD		0204	
7	LD		0014		66	DIFD	11	0205	
8	DIFD	11	0015		67	LD		0205	
9	LD		0015		68	LD		0203	
10	LD		0013		69	OR		0410	1 scan time on at star
11	OR		0410	1 scan time on at start	70	KEEP	12	0206	
12	KEEP	12	0108		71	LD		0206	
13	LD		0108		72	OUT		0105	BOX#03 SIDE A
14	OUT		0101	BOX#01 SIDE A	73	LD		0202	
15	LD		0012		74	AND		0206	
16	AND		0108		75	LD		0204	
17	LD		0014		76	AND-NOT		0206	
18	AND-NOT		0108		77	OR-LD			
19	OR-LD				78	OUT		0207	
20	OUT		0109		79	LD		0208	
21	LD		0110		80	AND-NOT-T/C	02		
22	AND-NOT-T/C	00			81	OR		0207	
23	OR		0109		82	OUT		0208	
24	OUT		0110		83	LD		0208	0.2sec Res. Duration
25	LD		0110		84	TIM	02	#0002	0.2sec Res. Duration
26	TIM	00	#0002	0.2sec Res. Duration	85	LD		0208	
27	LD		0110		86	AND-NOT-T/C	02		
28	AND-NOT-T/C	00			87	OUT		0104	BOX#3 Res.
29	OUT		0100	BOX#01 Res.	88	LD		0008	BOX #04 PROGRAM
30	LD		0004	BOX #02 PROGRAM	89	DIFD	11	0209	
31	DIFD	11	0111		90	LD		0209	
32	LD		0111		91	DIFD	11	0210	
33	DIFD	11	0112		92	LD		0009	
34	LD		0005		93	DIFD	11	0211	
35	DIFD	11	0113		94	LD		0211	
36	LD		0113		95	DIFD	11	0212	
37	DIFD	11	0114		96	LD		0212	
38	LD		0114		97	LD		0210	
39	LD		0112		98	OR		0410	1 scan time on at star
40	OR		0410	1 scan time on at start	99	KEEP	12	0213	
41	KEEP	12	0115		100	LD		0213	
42	LD		0115		101	OUT		0107	BOX#04 SIDE A
43	OUT		0103	BOX#02 SIDE A	102	LD		0209	
44	LD		0111		103	AND		0213	
45	AND		0115		104	LD		0211	
46	LD		0113		105	AND-NOT		0213	
47	AND-NOT		0115		106	OR-LD			
48	OR-LD				107	OUT		0214	
49	OUT		0200		108	LD		0215	
50	LD		0201		109	AND-NOT-T/C	03		
51	AND-NOT-T/C	01			110	OR		0214	
52	OR		0200		111	OUT		0215	
53	OUT		0201		112	LD		0215	
54	LD		0201		113	TIM	03	#0002	0.2sec Res. Duration
55	TIM	01	#0002	0.2sec Res. Duration	114	LD		0215	
56	LD		0201		115	AND-NOT-T/C	03		
57	AND-NOT-T/C	01			116	OUT		0106	BOX#04 Res.
58	OUT		0102	BOX#02 Res.	117	END	01		